Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p.441- 451

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۴۵۱-۴۴۱



Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper



Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste

Reza Safari[1*], Seyed Vali Hosseini[2], Sharareh Firouzkandian[1], Soheyl Reyhani Poul[3], Mona Kazemi[4]

Received: 2021.06.27
Revised: 2021.10.08
Accepted: 2021.11.13
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Safari, R., Hosseini, V., Firouzkandian, Sh., Reyhani Poul, S., Kazemi, M. (2022). Quantitative evaluation of amino acids and fatty acids profiles of biosilage produced from chicken waste. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 441-451.

Abstract

Introduction: One way to turn chicken waste into high value-added product is to produce fermented silage (biosilage). This product is superior to fish powder due to its characteristics such as high quality protein, probiotic bacteria and low price and can be considered as a suitable alternative for feed industry. Silage can be produced from protein wastes by both acidic and biological methods. The acidic method of producing silage (acidic silage) uses a variety of organic and inorganic acids such as formic acid and sulfuric acid. In the production of biological silage, two methods of autolysis (using internal enzymes) and fermentation (using microbial starters) are used. Starters used for inoculation are mainly from the group of lactic acid bacteria. To produce silage, protein wastes are used, especially fish wastes. Since poultry waste has not been used for biosilage production in the country so far, the aim of the present study is to produce biological silage from chicken waste and evaluate the profile of amino acids and fatty acids in the biosilage.

Materials and methods: Chicken intestine was prepared from meat production complex in Golestan province, Kordkoy city and also Simin Naz poultry industrial slaughterhouse in Sari and was transferred to the processing pilot of Caspian Sea Ecology Research Institute in the shortest time in cold container. During the biosilage production process, protein-degrading bacteria (containing protease enzymes such as gram-positive sporulated bacteria) and acid-producing bacteria (to reduce the pH of the suspension and accelerate the fermentation process, such as lactic acid bacteria) were used as initiator bacteria or microbial starters for intestinal digestion. The product was analyzed for protein, fat, moisture and ash according to standard methods. In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) of Cecil model (Seri 200) was used for amino acids analysis. Samples were prepared for assaying amino acids profile in two stages including hydrolysis and derivatization and the results were expressed in grams per 100 grams of substrate. To determine the fatty acids composition of the biosilage sample, the fat was first extracted. In order to evaluate the profile of fatty acids, a Shimadzu model gas chromatography device was used and the results were expressed as a percentage.

Results and discussion: The product produced contained about 60% protein and 21% fat. According to the results, the total of essential amino acids in the produced biosilage was 24.416, the total of non-essential amino acids was

1. Caspian Sea Ecology Research Institute, Fisheries Science Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization, Sari, Iran
2. Campus of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan, Iran.
4. General Department of Fisheries of Mazandaran Province, Babolsar, Iran
(*Corresponding Author Email: safari1351@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71188.1067

30.959 and the total of essential and non-essential amino acids was 55.375 g per 100 g of substrate. Among essential amino acids, the highest amount belonged to the amino acids leucine (7.334±0.45 g/100g) and valine (4.71±0.27 g/100g) and among non-essential amino acids, the highest amount belonged to glutamic acid (10.6±0.73 g/100g) and alanine (5.864±0.81 g/100g). It was also found that all essential amino acids except tryptophan are present in biosilage. Evaluation of biosilage fatty acids profile revealed that the total amount of saturated fatty acids (SFA) was 33.57%, monounsaturated fatty acids (MUFA) was 41.17% and polyunsaturated fatty acids (PUFA) was 24.36%. It was further found that in biosilage the total omega 3 was 2.07%, the total omega 6 was 22.91% and the sum of EPA and DHA was 2.06%.

The profile of amino acids and fatty acids in the biosilage produced from chicken waste is almost the same as that of other products made from protein waste (such as fish meal, fish waste biosilage and hydrolyzed protein powder). This property, along with cheap production and high nutritional value, allows the use of biosilage obtained from chicken waste in the livestock, poultry and aquatics feed industry.

Keywords: Chicken waste, Biosilage, Amino acids profile, Fatty acids profile, Fish powder.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 441- 451




نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۴۵۱-۴۴۱

مقاله علمی-پژوهشی

سنجش کمی ترکیب اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب سیلاژ بیولوژیک تولیدشده از ضایعات مرغ

رضا صفری[1]*- سیدولی حسینی[2]- شراره فیروزکندیان[1]- سهیل ریحانی پول[3]- مونا کاظمی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

یکی از راه‌های تبدیل ضایعات مرغ به محصولی با ارزش افزاوده بالا، تولید سیلاژ بر پایه تخمیر است (بیوسیلاژ). این محصول به دلیل دارابودن ویژگی‌هایی مانند میزان پروتئین بالا و با کیفیت، باکتری‌های پروبیوتیک و قیمت پائین نسبت به پودر ماهی ارجحیت دارد و می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای آن مطرح باشد. هدف از مطالعه حاضر در مرحله اول تولید بیوسیلاژ از ضایعات مرغ و در مرحله بعد بررسی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول بود. مطابق یافته‌ها، در بیوسیلاژ تولیدشده، مجموع اسیدهای آمینه ضروری، ۲۴/۴۱۶، مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری، ۳۰/۹۵۹ و مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری، ۵۵/۳۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا بوده است. همچنین مشخص شد که تمامی اسیدهای آمینه ضروری به غیر از تریپتوفان در بیوسیلاژ وجود دارند. بررسی پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ نشان داد که در این محصول مجموع اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، اسیدهای چرب تک‌زنجیره غیراشباع (MUFA) و اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع (PUFA) به‌ترتیب ۳۳/۵۷، ۴۱/۱۷، ۲۴/۳۶ درصد می‌باشند. ضمن اینکه در محصول تولیدشده مجموع امگا۳، ۲/۰۷ درصد، مجموع امگا۶، ۲۲/۹۱ درصد و مجموع EPA و DHA، ۲/۰۶ درصد است. از مقایسه پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر و سایر محصولات مشابه (مانند پودر ماهی، روغن ضایعات ماهی و مرغ، پروتئین‌های آبکافتی حاصل از ضایعات) مشخص شد که بیوسیلاژ از ارزش غذایی کافی جهت استفاده در صنعت تغذیه آبزیان، دام و طیور برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: ضایعات مرغ، بیوسیلاژ، پروفیل اسیدهای آمینه، پروفیل اسیدهای چرب، پودر ماهی

مقدمه

اصطلاح سیلاژ یا شیرابه سیلویی به فرآورده یا محصولی گفته می‌شود که در نتیجه تخمیر یا هیدرولیز موادی با ماهیت پروتئینی و یا کربوهیدراتی تولید می‌شود. تولید سیلاژ از تخمیر ساقه و برگ علوفه‌هایی همچون ذرت، جو یا دیگر اضافه‌های مزرعه فرآوری، از قدیم انجام می‌شود و خوراک ویژه برای دام می باشد. با تولید سیلاژ، علوفه به مدت طولانی‌تری نگهداری شده و حاوی مواد سودمند و انرژی زا برای تقویت دام است (Palkar et al., Perez, 2018, 2018). سیلاژ با دو روش اسیدی و بیولوژیک از ضایعات پروتئینی قابل تولید است. در روش اسیدی تولید سیلاژ (سیلاژ اسیدی) از انواع اسیدهای آلی و معدنی مانند اسید فرمیک و اسید سولفوریک استفاده می‌شود. در تولید سیلاژ بیولوژیک از دو روش اتولیز (با استفاده از آنزیم‌های داخلی) و تخمیر (با استفاده از استارترهای میکروبی) استفاده می‌گردد. استارترهای مورد استفاده جهت تلقیح عمدتا از گروه باکتری‌های لاکتیکی می‌باشند (Palkar et al., Perez, 2018, 2018).

یکی از روش‌های تولید سیلاژ استفاده از باکتری‌های تولیدکننده آنزیم‌های پروتئاز به‌عنوان استارتر می‌باشد. برای تولید بیوسیلاژ نیاز به منابع کربوهیدرات (ملاس، آرد، نشاسته) است. در واقع باکتری‌های تجزیه‌کننده، از پروتئین امعاء و احشاء (ضایعات)، به‌عنوان منبع نیتروژن و از منابع کربنی به‌عنوان کربوهیدرات استفاده کرده و باعث تبدیل ماده جامد به یک مایع هیدرولیزشده می‌شوند. به دلیل pH اسیدی محصول تولیدشده، زمان ماندگاری آن بالا بوده و تحت تأثیر

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.
۲- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده شیلات و محیط زیست، گرگان، ایران.
۴- اداره کل شیلات استان مازندران، بابلسر، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: safari1351@gmail.com
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71188.1067

آلودگی‌های ثانویه قرار نمی‌گیرد. محصول تولیدشده به‌واسطه پروتئین قابل هضم بالا و پروفیل اسیدهای آمینه کافی، قابلیت استفاده در فرمولاسیون جیره آبزیان را دارا بوده و می‌توان از آن به‌عنوان جایگزین نسبی و یا کامل پودر ماهی استفاده نمود. گران‌ترین ماده مورد استفاده در جیره آبزیان، پودر ماهی است و در نتیجه پس از جایگزین نمودن پودر ماهی با بیوسیلاژ، قیمت تمام‌شده جیره غذایی تهیه‌شده به‌طورچشمگیری کاهش می‌یابد

(Palkar et al., 2018, Perez, 2018). بنابراین عمده‌ترین مزایای بیوسیلاژ در مقایسه با پودر ماهی شامل موارد ذیل می‌باشد.

۱. قابلیت هضم پروتئین: آزمایشات نشان داده که پروتئین قابل هضم در بیوسیلاژ ماهی و طیور بین ۸۹– ۸۵ درصد و در پودر ماهی ۶۸ درصد می‌باشد (Safari et al., 2019).

۲. درصد پروتئین خام: بیوسیلاژ تولید شده عمدتاً دارای پروتئین خام بالاتری (۶۶ درصد) در مقایسه با پودر ماهی (۵۳/۶۱– ۶۸/۸۲ درصد) می باشد (Janbakhsh et al., 2018). محاسبه پروتئین خام در محصولات مختلف بر پایه نیتروژن می‌باشد. متأسفانه برخی از شرکت‌های تولیدکننده خوراک آبزیان، از مواد نامتعارف نظیر پودر پر و یا اوره به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند. بنابراین در محصول نهایی، علاوه بر درصد پروتئین خام، تعیین پروفیل اسیدهای‌آمینه و قابلیت هضم پروتئین از فاکتورهای کلیدی بوده که کیفیت جیره را مشخص می‌کنند.

۳. محصول دارای پروبیوتیک: به‌واسطه استفاده از باکتری های مفید در فرآیند تولید بیوسیلاژ، محصول تولید شده غنی از باکتری‌هایی نظیر گروه لاکتیک، باسیلوس‌ها و مخمرها است و در حقیقت نیازی به هزینه بیشتر جهت غنی‌سازی محصول با پروبیوتیک‌های دیگر نمی‌باشد.

۴. تکنولوژی تولید: خط تولید پودر ماهی بسیار پیچیده و هزینه خرید و نگهداری تجهیزات مورد استفاده بسیار بالا است. ضمن اینکه راه‌اندازی این خط تولید نیازمند سرمایه‌گذاری کلان می‌باشد. در صورتی که خط تولید بیوسیلاژ بسیار ساده‌تر بوده و با حداقل سرمایه می‌توان اقدام به تولید محصولی با ارزش افزوده بالا نمود (Safari et al., 2019).

جهت تولید سیلاژ از ضایعات پروتئینی به‌خصوص ضایعات آبزیان استفاده می‌شود. از آنجا که در داخل کشور تاکنون از ضایعات طیور جهت تولید بیوسیلاژ بهره‌گیری نشده است، لذا هدف تحقیق حاضر تولید سیلاژ بیولوژیک از ضایعات مرغ و ارزیابی پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول است. میزان ضایعات غیرقابل استفاده مرغ پس از کشتار، معادل ۱۶/۵ درصد است و پیش‌بینی ضایعات تولید شده با توجه به تعداد کشتارگاه‌های طیور در سطح کشور، معادل چندین هزار تن در روز خواهد بود. با بهره‌گیری از روش‌های زیست فناوری می‌توان ضایعات طیور را به محصولاتی با ارزش افزوده بالا مانند بیوسیلاژ تبدیل و در صنعت آبزی‌پروری به عنوان جایگزینی مناسب برای پودر ماهی استفاده نمود. لذا در این تحقیق برای نخستین بار بیوسیلاژ از روده مرغ تولید و پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب محصول نهایی ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

تولید بیوسیلاژ

برای انجام کار در مقیاس پایلوت نیاز به تولید اولیه بیوسیلاژ در مقیاس آزمایشگاهی بود تا پس از انجام آزمون و خطا و اتخاذ بهترین روش، جهت تهیه و آماده‌سازی امکانات و تجهیزات اولیه در مقیاس پایلوت اقدام شود. بدین منظور روده مرغ از مجتمع تولید گوشت در استان گلستان، شهرستان کردکوی و همچنین کشتارگاه صنعتی طیور سیمین ناز ساری تهیه و در مجاورت زنجیره سرد و در کوتاه‌ترین زمان به پایلوت فرآوری پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از انجمادزدایی، نمونه‌ها چرخ و به فرمانتور یک تنی استیل انتقال داده شد. در مرحله بعد پس از غیرفعال‌کردن آنزیم‌های داخلی و همچنین باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی (*سالمونلا تیفی موریوم*[1] و *اشریشیا کلی*[2]) با استفاده از تیمار حرارتی (۷۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه)، دمای فرمانتور به دمای محیط کاهش داده شد تا شرایط ثابت گردد. سپس از باکتری‌های تجزیه‌کننده پروتئین (*باسیلوس سوبتیلیس*[3] و *باسیلوس لیکنوفورمیس*[4]) و باکتری‌های تولیدکننده اسید (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[5]، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*[6]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[7]، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*[8]، *لاکتوباسیلوس کازئیی*[9]) به‌منظور کاهش pH سوسپانسیون و تسریع‌نمودن فرآیند تخمیر تحت عنوان باکتری‌های آغازگر یا استارترهای میکروبی جهت هضم روده استفاده شد. میزان تلقیح باکتری‌ها به صورت مخلوط و در لوگ ۸ به میزان ۵ درصد ماده اولیه بوده است. لازم به ذکر است که باکتری‌های مورد استفاده انحصاری بوده و دارای ویژگی‌هایی نظیر رشد در pH اسیدی، توانایی رشد در

1 *Salmonella typhimurium*
2 *Escherichia coli*
3 *Bacillus subtilis*
4 *Bacillus licheniformis*
5 *Lactobacillus plantarum*
6 *Lactobacillus bulgaricus*
7 *Lactobacillus rhamnosu*
8 *Pediococcus acidilactici*
9 *Lactobacillus casei*

دمای ۷۰ درجه تا ۶ ساعت و همچنین خواص پروتئازی بالا می‌باشند. به هنگام اضافه‌نمودن استارترهای میکروبی، منبع کربوهیدرات (ملاس نیشکر) به‌طور توأمان نیز اضافه گردید (به مقدار ۱۰ درصد ماده اولیه). در مرحله نهایی، دمای فرمانتور در محدوده ۴۵- ۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این شرایط قرار گرفتند. در طی انجام فرآیند، همزن فرمانتور در فواصل زمانی معین فعال و نمونه‌ها کاملا هموژن شدند. پس از اتمام فرآیند، نمونه‌ها از دستگاه جداکننده یا سپراتور عبور داده شدند تا روغن موجود در نمونه جدا گردد. این امر باعث می‌گردد که نمونه‌ها بهتر خشک شده و زمان ماندگاری آن نیز افزایش یابد (درصد روغن جداشده با استفاده از دستگاه سپراتور بین ۱۲- ۱۰ درصد بود). بعد از جدا کردن روغن از نمونه اصلی حاوی پروتئین تجزیه شده، با اضافه نمودن کنجاله کنجد (۳ درصد)، مقدار ماده خشک در نمونه‌های تخمیرشده را افزایش داده تا در نهایت خشک‌کردن محصول با کیفیت بهتری انجام گیرد. نمونه‌ها با استفاده از خشک‌کن صنعتی و در دمای۶۰- ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸- ۶ ساعت خشک شدند. در مرحله نهایی، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه آسیاب به مش‌های یکسان تبدیل و بسته‌بندی و در مکان خشک و خنک نگهداری شدند.

ترکیب شیمیایی محصول

پروتئین خام

برای اندازه‌گیری پروتئین خام، ۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد چرا که بخارات متصاعد شده از بالن هضم سوزاننده است. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سود ۵۰ درصد اضافه گردید و روی حرارت قرار داده شد. چون واکنش گرمازا است، قسمت‌های اتصال دستگاه کنترل شد تا از خروج گازهای متصاعد شده به خارج جلوگیری گردد. سپس۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل‌رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به‌طوری که انتهای لوله متصل به رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ور گردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع شده و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. در مرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچگونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشد. در پایان محتوای ارلن توسط اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد (National standard of Iran with number 924, 1993; AOAC, 2005). میزان پروتئین خام از رابطه زیر به‌دست آمد:

(۱) ۱۰۰۰× (گرم نمونه خشک)/ (۱۰۰× ۱۴× نرمالیته اسید× حجم اسید مصرفی برای نمونه) = درصد نیتروژن

(۲) (فاکتور پروتئین) ۶/۲۵ ×درصد نیتروژن= درصد پروتئین خام

خاکستر

۵ گرم از نمونه به داخل کروزه منتقل و سپس بر روی شعله حرارت داده شد. حرارت‌دادن تا عدم تصاعد دود از کروزه ادامه داشت. کروزه‌ها در داخل کوره و در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت حرارت داده شدند. با ظاهرشدن خاکستر سفید، نمونه‌ها از کوره خارج و برای سردشدن در داخل دسیکاتور قرار داده شدند و سپس وزن آن‌ها مشخص گردید (National standard of Iran with number 744, 2002; AOAC, 2005). درصد خاکستر با فرمول ذیل محاسبه گردید.

(۳) ۱۰۰ × (وزن نمونه خشک/ وزن خاکستر)= درصد خاکستر

رطوبت

پتری‌های حاوی نمونه (۱۰ گرم) به مدت ۶ ساعت در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس جهت سردشدن به دسیکاتور منتقل و در نهایت وزن آن‌ها ثبت گردید (National standard of Iran with number 745, 1971; AOAC, 2005). برای محاسبه میزان رطوبت نمونه از رابطه زیر استفاده شد. در این رابطه m_1 وزن ظرف و نمونه قبل از خشک‌کردن، m_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m_0 وزن نمونه است.

(۴) $[(m_1 - m_2)/m_0] \times$ ۱۰۰= درصد رطوبت

چربی

مقدار ۲۰ گرم از نمونه به داخل دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱۶۰ میلی‌لیتر متانول و به همین میزان کلروفرم به دکانتور اضافه گردید. با اضافه‌کردن آب مقطر به مجموعه، فازها از یکدیگر جدا شدند. نسبت متانول، کلروفرم و آب ۲: ۲: ۱/۶ بود. سپس لایه کلروفرمی محتوی چربی به‌وسیله دستگاه روتاری خارج گردید. با خروج حلال و توزین مجدد بالن، مقدار چربی نمونه بر حسب درصد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (National standard of Iran with number 742, 2001; AOAC, 2005).

(۵) ۱۰۰× (وزن اولیه/ وزن نمونه چربی) = درصد چربی

سنجش پروفیل اسیدهای آمینه

جهت آنالیز اسیدهای آمینه، نمونه‌ها پس از دیفراست به خوبی مخلوط و یکنواخت شدند. در این مطالعه برای آنالیز اسیدهای آمینه از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC، Cecil ، انگلیس) استفاده و آماده‌سازی نمونه‌ها در دو مرحله انجام شد.

مرحله اول: هیدرولیز نمونه برای به‌دست آوردن آمینواسیدهای آزاد؛ ۰/۵ گرم از نمونه بیوسیلاژ به همراه ۰/۲۵ میلی‌لیتر از محلول نورولوسین به لوله‌های هیدرولیز اضافه شدند. مقدار ۲۴ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۶ نرمال به لوله‌های حاوی نمونه اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه مجاور گاز نیتروژن قرار گرفتند و بلافاصله درپوش آن ها گذاشته شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و سپس لوله‌های درپوش‌دار در آون با دمای ۱۱۲ تا ۱۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت برای هیدرولیز قرار داده شدند. پس از پایان عمل هیدورلیز، لوله‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا سرد شوند. نمونه‌های موجود به سیلندر ۵۰ سی‌سی منتقل و با آب دارای درجه خلوص ویژه HPLC به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. در انتها، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده، صاف شد و با استفاده از آون متصل به پمپ خلاء به آرامی خشک گردید.

مرحله دوم: مرحله مشتق‌سازی؛ به هر لوله حاوی نمونه، ۲۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌سازی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب با درجه خلوص ویژه HPLC است، ۱۰۰ میکرولیتر تری اتیل آمین، ۷۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر فنیل ایزوتیوسیانات اضافه شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در جای ثابت (دمای اتاق) قرار داده شدند تا به‌خوبی واکنش مشتق‌سازی انجام شود. در انتهای آزمایش در این مرحله، نمونه‌ها و استاندارد در آون متصل به پمپ خلا به آرامی خشک شدند. برای قرائت با دستگاه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر رقیق‌کننده، به لوله حاوی استاندارد و لوله‌های حاوی نمونه افزوده و به آرامی ورتکس شدند. در مرحله بعد، برای لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ انجام شد. در انتها از مایع رویی (سوپرناتانت) لوله‌ها به مقدار ۲۰ میکرولیتر جدا و به دستگاه HPLC با مشخصات جدول ۱ تزریق شد (Moore, 2004).

جدول ۱- مشخصات دستگاه HPLC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای آمینه

Table 1- Specifications of HPLC device for quantitative and qualitative analysis of amino acids

Device name	HPLC (Cecil)
Pump	Cecil: Seri 200
Detector	Knauer
Column	C18 (15cm × 4.6 mm) –Phenomenex
The wavelength used	238 nm
Solvent passage speed	1 ml/min
Solvent composition	Acetate buffer + Hexansulfonate + CU acetate
Analysis method	Isocratic
The software used	CHRUMuLan

سنجش پروفیل اسید چرب

جهت تعیین ترکیب اسیدهای چرب در نمونه بیوسیلاژ، ابتدا چربی نمونه استخراج شد. بدین ترتیب که ابتدا ۱ گرم نمونه به بالون ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و سپس ۵ میلی‌لیتر متانول به نمونه افزوده و به شدت تکان داده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و مجددا بالن ژوژه به شدت تکان داده شد. نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردید تا چربی بافت کاملاً خارج شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها به دکانتور منتقل و به آن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و بعد از یک ساعت سه فاز مجزا در داخل دکانتور تشکیل شد. فاز چربی و حلال که در قسمت زیرین دکانتور وجود داشت با استفاده از قیف و کاغذ صافی جدا و به ظرف مخصوص منتقل و به کمک نیتروژن حلال‌پرانی شد که در نهایت چربی باقی ماند. جهت استری-کردن چربی از روش ISO 5509 (2000) استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر سود متانولی ۲ درصد به چربی استخراج‌شده اضافه گردید. سپس درب ظرف بسته و به شدت تکان داده شد. ظرف حاوی نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت و پس از خنک شدن، ۲/۲ میلی‌لیتر محلول BF_3 (تری فلوراید بور) به ترکیب اضافه و سپس ۳ دقیقه مجددا در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن، به ترکیب فوق، ۱ میلی‌لیتر ان–هگزان نرمال اضافه گردید. به این محلول (بعد از تکان دادن)، ۱ میلی‌لیتر محلول نمک اشباع (۳۰۰ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) نیز اضافه شد. ترکیب فوق به شدت تکان داده شد و تا زمان تشکیل دو فاز مختلف، ظرف حاوی نمونه در محلی خاص قرار گرفت. فاز بالایی با دقت جدا و برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC، Shimadzu، ژاپن) با مشخصات جدول ۲ استفاده شد.

پس از تهیه متیل استر اسیدهای چرب، حدود ۱ میکرولیتر از نمونه مورد آزمایش به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مکان هر یک از اسیدهای چرب براساس زمان بازداری آن¬ها در نمونه استاندارد شناسایی و به صورت گرم در ۱۰۰ گرم چربی نمونه بیان گردید (ISO 5509, 2000).

جدول ۲- مشخصات دستگاه GC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای چرب

Table 2- Specifications of GC device for quantitative and qualitative analysis of fatty acids

Device name	GC (Shimadzu)
Column temperature	191°C
Injection temperature	215°C
Detector temperature	320°C
Detector type	(F.I.D.) Flame Ionization Detector
Column type	BPX70
Carrier gas	Nitrogen
Flow intensity	0.6 ml/min

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولید شده

در جدول ۳ ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده ارائه شده است. این محصول دارای حدود ۶۰ درصد پروتئین و ۲۱ درصد چربی می باشد. بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلا دارای ۵۲/۸ درصد پروتئین و ۸/۵۲ درصد چربی بود (Safari et al., 2019). میزان پروتئین، چربی و خاکستر در بیوسیلاژ بسته به شرایط تولید و نوع سوبسترا می‌تواند متفاوت باشد. میزان پروتئین و چربی در پودر ماهی آنچوی ۷۴/۶۹ و ۸/۶۱ درصد اندازه‌گیری شد (Turan et al., 2007). میزان پروتئین در پودر ماهی آنچوی بیشتر از بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر بود اما سطح چربی این پودر از بیوسیلاژ کمتر است.

جدول ۳- ترکیب شیمیایی بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 3- Chemical composition of biosilage produced from poultry waste

Chemical composition	Amounts
Protein	59.09 ±0.49
Fat	21.3 ±0.45
Moisture	9.32 ±0.61
Ash	6.17 ±0.17

پروفیل اسیدهای آمینه

نتایج پروفیل اسیدهای آمینه بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ در جدول ۴ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که تمامی اسیدهای آمینه ضروری به غیر از تریپتوفان در بیوسیلاژ وجود دارند. مطابق نتایج، در بیوسیلاژ تولید شده، مجموع اسیدهای آمینه ضروری، ۲۴/۴۱۶، مجموع اسیدهای آمینه غیرضروری، ۳۰/۹۵۹ و مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری، ۵۵/۳۷۵ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا می‌باشد. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در بین اسیدهای آمینه ضروری بالاترین مقدار متعلق به اسید آمینه لوسین (۰/۴۵ ±۷/۳۳۴ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و والین (۰/۲۷ ±۴/۷۱ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و در بین اسیدهای آمینه غیرضروری بالاترین مقدار مربوط به گلوتامیک‌اسید (۰/۷۳ ±۱۰/۶ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) و آلانین (۰/۸۱ ±۵/۸۶۴ گرم در ۱۰۰ گرم سوبسترا) بوده است. مجموع اسیدهای آمینه ضروری بیوسیلاژ تولیدشده از ماهی *Merluccius hubbsi* ۲۷/۱ گرم در ۱۰۰ گرم بود که کمی بیشتر از این مقدار در بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر است (Fernández Herrero et al., 2015). مقادیر و نوع اسیدهای آمینه در محصول تولید شده، با پودر ماهی مقایسه شد (Janbakhsh et al., 2018). نتایج نشان داد که نسبت اسیدهای آمینه ضروری به اسیدهای آمینه غیرضروری هر دو محصول نزدیک به هم (تقریبا برابر) است و از این نظر تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در تحقیق Janbakhsh و همکاران (۲۰۱۸) نسبت E/NE (ضروری به غیرضروری) پودر ماهی، ۰/۷۸۴ بود که این مقدار برای بیوسیلاژ ضایعات مرغ نیز ۰/۷۸۸ ثبت گردید (برابر) (Janbakhsh et al., 2018). در مطالعه Vidotti و همکاران (۲۰۰۳) پروفیل اسیدهای آمینه در سیلاژ تولیدشده از ضایعات ماهیان آب شور، آب شیرین و تیلاپیا که به روش‌های اسیدی و بیولوژیک تولید شدند بررسی شد (Vidotti et al., 2003). نتایج حاکی از آن است که مقادیر اسیدهای

آمینه و مجموع پروتئین موجود در بیوسیلاژ مطالعه مذکور در بیشتر موارد کمتر از بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ در تحقیق حاضر می‌باشد. اگر روش مورد استفاده که همان روش تخمیر با استفاده از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد را در نظر بگیریم، بیوسیلاژ تخمیری حاصل از ضایعات ماهیان آب شور شبیه به بیوسیلاژ تولید شده در مطالعه حاضر بوده است. به عبارت دیگر، درصد پروتئین و همچنین پروفیل برخی از اسیدهای آمینه در این دو بیوسیلاژ نزدیک به هم می‌باشد (آرژینین، والین و لوسین). در مطالعه Sarhadi و همکاران (۲۰۱۲)، پروفیل اسیدهای آمینه در استخوان سه ماهی کیلکای آنچوی (*C. engrauliformis*)، ساردین پهلو طلایی (*S. gibossa*) و موتوماهی (*S. indicus*) بررسی شد. میزان اسیدهای آمینه ضروری در استخوان این سه ماهی به‌ترتیب ۳۷/۹۵، ۳۸/۲ و ۳۶/۶۷ درصد بود که این مقادیر بیشتر از اسیدهای آمینه ضروری در بیوسیلاژ تهیه‌شده از ضایعات مرغ (۲۴/۴۱۶ درصد) در تحقیق حاضر است (Sarhadi et al., 2012). همچنین مقادیر اسیدهای آمینه غیرضروری و متعاقبا اسیدهای آمینه کل در استخوان سه ماهی مذکور بیشتر از بیوسیلاژ ضایعات مرغ بود. نتیجه پژوهش Taheri و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که مجموع اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری در پروتئین آبکافتی ضایعات کشتارگاهی مرغ به‌ترتیب ۴۲/۴۱ و ۲۹/۸۸ گرم در ۱۰۰ گرم است. اگرچه بیوسیلاژ تولیدشده در تحقیق حاضر از نظر میزان اسیدهای آمینه غیرضروری با پروتئین آبکافتی تولیدشده در مطالعه مذکور (Taheri et al., 2012) تقریبا برابر است اما دارای میزان اسیدهای آمینه ضروری کمتری می‌باشد.

جدول ٤- ترکیب اسیدهای آمینه در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 4- Amino acids composition (profile) in biosilage produced from poultry waste

Amino acids type	Amounts (g/100g substrate)
Histidine	0.773± 0.02
Arginine	3.613± 0.12
Threonine	1.085± 0.05
Valine	4.71± 0.27
Methionine	0.303± 0.01
Isoleucine	3.332± 0.23
Leucine	7.334± 0.45
Phenylalanine	1.814± 0.04
Lysine	1.452± 0.071
Tryptophan	0
Total essential amino acids	24.416
Aspartic acid	2.91± 0.16
Glutamic acid	10.6± 0.73
Serine	2.711± 0.47
Glycine	4.093± 0.21
Alanine	5.864± 0.81
Proline	2.938± 0.43
Tyrosine	1.806± 0.27
Cysteine	0.036± 0.008
Total non-essential amino acids	30.959
Total amino acids	55.375
E/NE	0.78

پروفیل اسیدهای چرب

در جدول ۵، نتایج پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ ارائه شده است. مطابق این جدول، در بیوسیلاژ، مجموع اسیدهای چرب اشباع شده (SFA)، ۳۳/۵۷، اسیدهای چرب تک‌زنجیره غیراشباع (MUFA)، ۴۱/۱۷ و اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع (PUFA)، ۲۴/۳۶ درصد می‌باشد. همچنین در این محصول، مجموع امگا۳، ۲/۰۷ درصد، مجموع امگا۶، ۲۲/۹۱ درصد و نسبت امگا۶ به امگا۳، ۱۱/۰۶ و در نهایت مجموع EPA و DHA، ۲/۰۶ درصد بوده است. پروفیل اسیدهای چرب بیان شده در جدول ۵، در حقیقت پروفیل اسیدهای چرب بیوسیلاژی است که روغن آن با استفاده از دستگاه سپراتور به‌طور نسبی جدا شده و درصد روغن در بیوسیلاژ به مراتب کمتر از بیوسیلاژ اولیه می‌باشد. بنابراین طبیعی است که درصد اسیدهای چرب در محصول نهایی اندکی پایین باشد. در مقایسه این مطالعه و سیلاژ تهیه‌شده از ماهی سی‌باس (*Dicentrarchus labrax*) (به روش‌های مختلف بیولوژیک و اسیدی) مشخص گردید که میزان اسیدهای چرب اشباع شده در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ بیشتر از مطالعه Ozyurt و همکاران (۲۰۱۸) است. این در حالیست که درصد اسیدهای چرب غیراشباع تک‌زنجیره و چندزنجیره در دو محصول تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. در مطالعه‌ای دیگر پروفیل اسیدهای چرب سیلاژ اسیدی و بیولوژیک تولیدشده از ضایعات ماهی با یکدیگر مقایسه شدند (Ozyurt et al., 2016).

جدول ۵- ترکیب اسیدهای چرب در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ

Table 5- Fatty acids composition (profile) in biosilage produced from poultry waste

Fatty acids type	Amounts (%)
C14:0	0
C15:0	0.54± 0.12
C16:0	25.77± 1.36
C18:0	7.26± 0.14
C17:0	0
C20:0	0
SFA	33.57
C16:1	3.65± 0.54
C17:1	0
C18:1(n9)C	37.65± 1.65
MUFA	41.17
C18:2(n6)C	22.18± 0.95
C18:3 n3	0
C20:3 n6	0
C20:4 n6 ARA	0.73± 0.45
C20:5 n3 EPA	0.87± 0.11
C22:5 n3 DPA	0
C22:6 n3 DHA	1.2± 0.021
PUFA	24.36± 1.32
n6/n3	11.06± 0.54
EPA+DHA	2.07± 0.11

نتایج نشان داد مجموع اسیدهای چرب چندزنجیره غیراشباع و نسبت امگا۳ به امگا۶ در سیلاژ بیولوژیک بیشتر از سیلاژ اسیدی است اما در سایر موارد اختلاف چندانی با هم ندارند. مقایسه پروفیل اسیدهای چرب سیلاژ ماهی در مطالعه مذکور با تحقیق حاضر نشان داد که میزان اسیدهای چرب تک‌زنجیره و چندزنجیره غیراشباع بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ بیشتر از سیلاژ بیولوژیک و اسیدی

تولیدشده از ضایعات ماهی می‌باشد. این در حالیست که بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ دارای میزان اسیدهای چرب اشباع کمتری است. در تحقیقی، نسبت امگا۶ به امگا۳ در روغن استخراجی از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار اسیدی و بازی به‌ترتیب ۶/۷۵ و ۵/۸۱ محاسبه شد (Flahatgar et al., 2016) که این ارقام در مقایسه با این نسبت در بیوسیلاژ تهیه شده از ضایعات مرغ کمتر است. مقادیر SFA، MUFA و PUFA در روغن استخراجی از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به روش آنزیمی به‌ترتیب معادل ۳۱/۴، ۳۴ و ۳۴/۴۹ درصد بود (Reyhani Poul et al., 2018). مقایسه این نتایج و یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ مقادیر بالاتری از SFA و MUFA را نسبت به روغن ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. مجموع EPAو DHA روغن ضایعات قزل‌آلا در پژوهش Reyhani Poul و همکاران (۲۰۱۸)، ۲۰/۳۷ درصد اندازه‌گیری شد که تقریبا ۱۰ برابر این مقدار در بیوسیلاژ تولید شده از ضایعات مرغ (۲/۰۶ درصد) است. نسبت MUFA به PUFA (مقاومت اکسایشی روغن‌ها)، PUFA به SFA (ارزش غذایی روغن‌ها)، امگا۳ به امگا۶ و DHA به EPA در روغن ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به‌ترتیب معادل ۰/۹۸، ۱/۰۹، ۴/۵۴ و ۱/۲۴ بود (Reyhani Poul et al., 2018). این نسبت‌ها در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ به‌ترتیب ۱/۶۹، ۰/۷۲، ۰/۰۹ و ۱/۳۷ می‌باشد. در مطالعه Turan و همکاران (۲۰۰۷)، پروفیل اسیدهای چرب پودر ماهی آنچوی ارزیابی و مشخص شد مقادیر SFA، MUFA و PUFA در این محصول به‌ترتیب ۳۲/۲۴۸، ۲۰/۲۲۸ و ۳۱/۹۸۴ درصد است (Turan et al., 2007). بیوسیلاژ تولید شده در تحقیق حاضر از نظر سطوح SFA و MUFA غنی‌تر است اما مقدار PUFA در آن نسبت به پودر ماهی آنچوی تولیدشده در تحقیق مذکور کمتر می‌باشد. مجموع امگا۳ و امگا۶ در پودر ماهی آنچوی به‌ترتیب ۲۷/۰۳۷ و ۴/۹۴۷ درصد بود. بیوسیلاژ تولید شده در تحقیق حاضر دارای امگا۳ کمتر اما امگا۶ بیشتری نسبت به پودر تولیدشده در پژوهش Turan و همکاران (۲۰۰۷) است. نسبت امگا۶ به امگا۳ در پودر آنچوی ۰/۱۸ بود که رقم کمتری نسبت به بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ (۱۱/۰۶) می‌باشد. روغن تولید شده از پوست مرغ (ضایعات) به روش آنزیمی (فلاورزایم) در مطالعه Fallah Delavar و Farmani (۲۰۱۸) دارای ۱ درصد امگا۳ و ۱۹/۳ درصد امگا۶ بود.

نتیجه‌گیری

پروفیل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب در بیوسیلاژ تولیدشده از ضایعات مرغ تقریبا هم‌سطح سایر فراورده‌هایی است که از ضایعات پروتئینی تولید می‌شوند (مانند پودر ماهی، بیوسیلاژ ضایعات ماهی و پودرهای پروتئین آبکافتی). این ویژگی در کنار تولید ارزان و ارزش غذایی بالا، امکان استفاده از بیوسیلاژ حاصل از ضایعات مرغ را در صنعت تغذیه دام، طیور و آبزیان فراهم می‌کند.

تشکر و قدردانی

محققین تحقیق حاضر بر خود لازم می‌دانند از اداره کل شیلات استان مازندران و پژوهشکده اکولوژی دریای خزر تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. AOAC. (2005). Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
2. Fallah-Delavar, M., and Farmani, J. (2018). Recovery and characterization of enzymatic protein hydrolyzates and Fat from chicken Skin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *95*(9), 1151-1161.
3. Fernández Herrero, A., Vittone, M., and Salomone, A. (2015). Biological silage of *Merluccius hubbsi*. Amino acid composition, degree of hydrolysis and peptides size. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research. 3* (6), 57-62.
4. Flahatgar, F., Zakipour Rahimabadi, E., and Rostamzad, H. (2016). Fatty acid profile and oxidation stability of oil extracted from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-product by isoelectric solubilization/precipitation. *Aquatic Animals Nutrition*, *2* (1), 1-14
5. ISO 5509. (2000). Animal and vegetable fats and oils- Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO/TC 34/SC 11. 24 p.
6. Janbakhsh, S., Hosseini Shekarabi, S. P., and Shamsaie Mergan, M. (2018). Nutritional value and heavy metal content of fishmeal from the Southwest Caspian Sea. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, *16*(4), 307-317.
7. Moore, J. (2004). Amino acid analysis of hydrolysates (feed, fxal, etc), Michign State University, Department of Animal Sciences, Nathalie Trottiers Laboratory.
8. National standard of Iran with number 742. (2001). Meat and its products- Fat measurement- Test method. Iran Standard and Industrial Research Institute.

9. National standard of Iran with number 744. (2002). Meat and its products- Ash measurement- Test method. Iran Standard and Industrial Research Institute.
10. National standard of Iran with number 745. (1971). Meat and its products- Moisture measurement. Iran Standard and Industrial Research Institute.
11. National standard of Iran with number 924. (1993). Measurement of total protein in meat and its products. Iran Standard and Industrial Research Institute.
12. Özyurt, G., Gökdoğan, S., Şimşek, A., Yuvka, I., Ergüven, M., and Kuley Boga, E. (2016). Fatty acid composition and biogenic amines in acidified and fermented fish silage: a comparison study. *Archives of Animal Nutrition*, *70*(1), 72-86.
13. Özyurt, G., Özkütük, A. S., Uçar, Y., Durmuş, M., and Özoğul, Y. (2018). Fatty acid composition and oxidative stability of oils recovered from acid silage and bacterial fermentation of fish (Sea bass–*Dicentrarchus labrax*) by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, *53*(5), 1255-1261.
14. Palkar, N. D., Koli, J. M., Gund, D. P., Patange, S. B., Shrangdher, S. T., Sadawarte, R. K., and Akhade, A. R. (2018). Preparation of co-dried fish silage by using fish market waste and its comparative study. *International Journal* of *Pure and Applied Bioscience*, *6*(2), 1567-1577.
15. Perez, R. 2018. Fish silage for feeding livestock. FAO Fishery Report No. 560. Rome, FAO. 86.
16. Reyhani Poul, S., Jafarpour, A., and Safari, R. (2018). Evaluation of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application of protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *14* (1), 162-176.
17. Safari, (2019). Production of biosilage from rainbow trout waste. Final report. Caspian Sea Ecological Research Center.
18. Sarhadi, N., Motamedzadegan, A., Taheri, A., and Azad, M. (2012). Comparison study of the proximate composition and amino acid profile in the bones of Goldstripe sardine (*Sardinella gibossa*), Anchovy kilka (*Clupeonella engrauliformis*) and Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *21* (1), 101-112
19. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., and Habibi Rezaie, M. (2012). Process optimization of poultry by-products hydrolysate production by RSM. *Iranian Journal of Food Science and Industry*, *34* (9), 65-76
20. Turan, H., Kaya, Y., and Erkoyuncu, İ. (2007). Protein and lipid content and fatty acid composition of anchovy meal produced in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *31*(2), 113-117.
21. Vidotti, R. M., Viegas, E. M. M., and Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, *105*(1-4), 199-204. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00056-7